Journal of Iranian Plant Protection Research
https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, 2024, p. 209-226

Identification, Molecular and Phylogenetic Characterization of Two Isolates of vinca mosaic virus Based on *p1* and *cp* Genes

S. Turang[1], M. Mehrvar[2]*, M. Zakiaghl[2]
1 and 2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)

Received: 24-05-2023 Revised: 15-01-2024 Accepted: 02-06-2024 Available Online:	**How to cite this article:** Turang, S., Mehrvar, M., & Zakiaghl, M. (2024). Identification, molecular and phylogenetic characterization of two isolates of *vinca mosaic virus* based on *p1* and *cp* genes. *Journal of Iranian Plant Protection Research, 38*(3), 209-226. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82191.1144

Introduction

Vinca minor or lesser periwinkle is a perennial, herbaceous and creeping plant belonging to the genus *Vinca* and the family *Apocynaceae.* In addition to being an ornamental and cover plant, *V. minor* is a valuable herbal plant in traditional medicine, and it also acts as a natural source for the industrial manufacture of brain blood flow stimulants. Periwinkle contains more than 150 alkaloids, which have been isolated from the aerial parts and roots of the plant, so far (Proksa *et al.*,1988), consisting of vincaminorine, vincaminoreine, minovine, minovincine, vincamine, which has antihypoxic and neuroprotective properties as well as modulatory effects on brain circulation and neuronal homeostasis (Farahanikia *et al.*, 2011). Vinca mosaic virus (VMV), belonging to the genus *Potyvirus* and the family *Potyviridae*, causes severe to mild mosaic symptoms, yellowing, blistering and leaf curl in the leaves of the periwinkle plant. In this study, the molecular and phylogenetic characteristics of two isolates of VMV were investigated via analysis of *p1* and *cp* genes.

Materials and Methods

Virus-like symptoms, such as mosaic and mottling, yellowing, blistering and leaf curling were found on the leaves of *V. minor* plants in the pardis campus of Ferdowsi University of Mashhad, Razavi Khorasan, Iran, during a survey in September 2019. Total RNA was extracted from the leaves with the SV Total RNA Isolation Kit to determine the causal agent(s) (Promega, USA). Deep sequencing was carried out on the samples by Macrogen Company in South Korea. Analysis of the results with CLC Genomics Workbench v.12.0.3 software showed that these plants were infected with two isolates of VMV. The *cp* and *p1* gene sequences of VMV isolates were determined. Clustal Omega software was used to compare multiple sequence alignments among sequences and determine the percentage of identities at the nucleotide and amino acid levels. To determine phylogenetic relationships and evolutionary origin of Iranian VMV isolates, phylogenetic tree was drawn based on nucleotide and amino acid sequences of *cp* and *p1* genes using MEGA 7 software and Maximum-Likelihood (ML) method with 1000 replications (Bootstrap). The SDT software (v.1.2) and Muscle sequencing were used to plot the similarity matrix among the isolates at the nucleotide and amino acid levels.

Results and Discussion

The identities between the *cp* gene of two Iranian VMV isolates (VMV-IR-1 and VMV-IR-2) at the nucleotide (nt) and amino acid (aa) levels were 93.11% and 97.00% respectively. For the *p1* gene, the obtained results showed 68.35% identity at the nt level and 97.00% at the aa level. The highest percent of nt identity of the VMV cp with other potyviruses in the GenBank was with ASV1 (asparagus virus 1) (75.00% with VMV-IR-1 and 73.82% with VMV-IR-2) VMV-IR-1 and VMV-IR-2 showed the highest aa identity with VDMV (vanilla distortion mosaic virus) (70.39%). The highest nt and aa identity of *p1* gene of VMV isolates was with CatMV (catharanthus mosaic virus) (52.29% VMV-IR-1 and 51.31% with VMV-IR-2) and ZTMV (zucchini tigre

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82191.1144

mosaic virus) (28.70%), respectively. Protected motifs were also identified in the *cp* and *p1* gene sequences. Dendrograms obtained from phylogenetic analysis based on nt and aa acid sequences of these genes placed two Iranian VMV isolates, along with other species of potyviruses in the GenBank, viruses in two and three separate groups respectively. Based on *cp* gene sequences, at the aa level Iranian VMV isolates is most closely related to yam mosaic virus (YMV) virus, and at the nt level with the closest viruses are include sweet potato virus 2 (SPV2), sugarcane mosaic virus (SCMV), onion yellow dwarf virus (OYDV) and johnsongrass mosaic virus (JGMV) in the same group. Based on the *p1* gene sequences, VMV isolates at the nt level were most closely related to the JGMV virus and at the aa level were most closely related to the YMV and celery mosaic virus (CeMV) viruses.

Conclusion

In this study, for the first time, the molecular properties of VMV isolates were determined based on the *cp* and *p1* genes, and the phylogenetic position of two Iranian VMV isolates was drown. The results showed that the *cp* gene can be used for taxonomic purposes. Considering the medicinal and ornamental properties of periwinkle and effect of the viruses on its properties, special attention should be paid to viral diseases of this plant.

Keywords: NGS, Phylogenetic analysis, *Potyvirus*, vinca mosaic virus

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۲۲۶-۲۰۹

شناسایی و بررسی خصوصیات مولکولی دو جدایه از ویروس موزائیک پیچ تلگرافی (vinca mosaic virus) بر مبنای ژن‌های *p1* و *cp*

ثریا تورنگ[۱]- محسن مهرور[۲*]- محمد زکی‌عقل[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۳

چکیده

ویروس موزائیک پیچ تلگرافی (*Vinca mosaic virus*, VMV) یک گونه جدید از پوتی‌ویروس‌هاست که به تازگی گزارش شده‌است، این ویروس روی گیاه پیچ تلگرافی نشانه‌های موزائیک شدید تا خفیف، تاولی، پیسک، زردی، چین‌دار شدن و پیچیدگی برگ ایجاد می‌کند. به‌منظور تعیین خصوصیات مولکولی و تبارزایی دو جدایه از ویروس موزائیک پیچ تلگرافی (VMV-IR-1, VMV-IR-2) بر مبنای ژن‌های *cp* و *p1*، ابتدا توالی ژن‌های *p1* و *cp* جدایه‌های موردنظر که با روش توالی‌یابی نسل جدید (Next generation sequencing, NGS) به‌دست آمده‌بودند با توالی سایر پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند، درصد تشابه میان ژن *cp* دو جدایه ایرانی VMV در سطح نوکلئوتیدی (nt) ۹۳٫۱۱ درصد و در سطح آمینواسیدی (aa) ۹۷٫۰۰ درصد بود. برای ژن *p1* نتایج نشان‌دهنده درصد تشابه ۶۸٫۳۵ در سطح نوکلئوتیدی و ۶۶٫۷۸ درصد در سطح آمینواسیدی بود. بیشترین درصد تشابه ژن *cp* جدایه‌های ویروس VMV با سایر پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی با asparagus virus 1 (ASV1) به میزان ۷۵٫۰۰ درصد با VMV-IR-1 و ۷۳٫۸۲ درصد با VMV-IR-2 بود و در سطح آمینواسیدی VMV-IR-1 و VMV-IR-2 بیشترین درصد تشابه را با *Vanilla distortion mosaic virus* (VDMV) به میزان ۷۰٫۳۹ درصد نشان دادند. بیشترین درصد تشابه ژن *p1* جدایه‌های VMV در سطح نوکلئوتیدی با *Catharanthus mosaic virus* (CatMV) به میزان ۵۲٫۲۹ درصد با VMV-IR-1 و ۵۱٫۳۱ درصد با VMV-IR-2 بود و در سطح آمینواسیدی VMV-IR-1 و VMV-IR-2 بیشترین درصد تشابه را با (ZTMV) zucchini tigre mosaic virus به میزان ۲۸٫۷۰ درصد نشان دادند. همچنین موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی ژن‌های *cp* و *p1* مشخص شدند. دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های مورد بررسی دو جدایه ایرانی VMV به همراه گونه‌های دیگر جنس پوتی‌ویروس موجود در بانک ژن، این ویروس‌ها را به‌ترتیب در دو و سه گروه مجزا از هم، طبقه‌بندی کرد. تعیین روابط تکاملی براساس ژن *cp* در سطح آمینواسیدی نشان داد که نزدیک‌ترین ویروس به جدایه‌های VMV، ویروس *Yam mosaic virus* (YMV) بود. درخت تبارزایی رسم‌شده بر اساس ژن *CP* در سطح نوکلئوتیدی، جدایه‌های VMV را با ویروس‌های *Sweet potato virus 2* (SPV2)، (SCMV) *Sugarcane mosaic virus*، *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) و *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) در یک گروه قرار داد. بر اساس توالی ژن *p1* جدایه‌های VMV در سطح نوکلئوتیدی نزدیکترین ارتباط را با ویروس JGMV دارند و در سطح آمینواسیدی با ویروس‌های YMV و *Celery mosaic virus* (CeMV) در یک گروه قرار می‌گیرند. تجزیه و تحلیل تبارزایی براساس ژن‌های *CP* و *P1*، جدایه‌های VMV را در میان اعضای جنس پوتی‌ویروس گروه‌بندی کرد. بنابراین تجزیه و تحلیل بر مبنای این دو ژن قابلیت تفکیک اعضای جنس پوتی‌ویروس را دارد. همینطور خصوصیات ژنومی ژن‌های *CP* و *P1* جدایه‌های VMV مشابه ویژگی‌های این دو ژن در سایر اعضای جنس پوتی‌ویروس است.

واژه‌های کلیدی: پوتی‌ویروس، پیچ‌تلگرافی، تجزیه و تحلیل تبارزایی، توالی‌یابی نسل جدید

۱ و ۲- گروه گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82191.1144

مقدمه

پروانش صغیر، وینکا یا پیچ تلگرافی (*Vinca minor* L.) گیاهی پایا، علفی و خزنده متعلق به جنس *Vinca* و خانواده خرزهره (Apocynaceae) است. گیاه پروانش علاوه بر اینکه گیاه زینتی و پوششی است دارای خواص دارویی نیز می‌باشد و بیش از ۱۵۰ نوع آلکالوئید از جمله وین‌بلاستین و وین‌کریستین که در شیمی‌درمانی و درمان انواع سرطان و آجمالیسین که برای درمان فشارخون بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند در آن شناخته شده است (Ciorita *et al.*, 2021). گونه *V. minor* حاوی آلکالوئیدهای ایندول از نوع مونومرهای ابورنامین شامل وینکامین‌ها که دارای اثرات تعدیل‌کنندگی روی جریان خون در مغز و هموستازی سلول‌های عصبی و همچنین آنتی هیپوکسی و توانایی محافظت از نورون هستند می‌باشد (Moudi *et al.*, 2013; Thawabteh *et al.*, 2019).

جدا از بحث تأثیر ویروس‌ها روی فعالیت‌های عمومی گیاه، با توجه به دارویی بودن گیاه پیچ‌تلگرافی و تأثیر ویروس‌ها بروی میزان تولید آلکالوئیدها و متابولیت‌های ثانویه، بیماری‌های ویروسی روی این گیاه از اهمیت بیشتری برخوردار است. تاکنون بیماری‌های مختلفی روی گیاه پیچ‌تلگرافی گزارش شده‌است (Al-Zahrani *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2008; El-Dougdoug *et al.*, 2007;2017 Al-Zahrany *et al.*, 2019). از ویروس‌های گزارش شده از *Vinca minor* می‌توان ویروس پیچ‌خوردگی برگ پدیلانتوس (*Pedilanthus leaf curl virus*, PLCV) (Saleem Haider *et al.*, 2008)، ویروس موزاییک آرابیس (*Arabis mosaic virus*, ArMV) (Fisher, 2013)، ویروس موزاییک بذرزاد نخودفرنگی (*Pea seed-borne mosaic virus*, PsbMV)، ویروس موزائیک خفیف رگه‌ای فلفل (*Pepper veinal mottle virus*, PVMV)، ویروس موزاییک هندوانه (*Watermelon mosaic virus*, WMV) (Brunt *et al.*, 1996) و ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Fisher, 2012) را نام برد. ویروس موزائیک پیچ‌تلگرافی (*Vinca mosaic virus*) متعلق به جنس *Potyvirus* و خانواده Potyviridae عامل ایجاد نشانه‌های موزائیک شدید تا خفیف، زردی، تاولی، پیسک، چین‌دار شدن و پیچیدگی در برگ‌های گیاه پیچ‌تلگرافی است که به عنوان یک گونه جدید از جنس *Potyvirus* می‌باشد.

خانواده پوتی‌ویریده (Potyviridae) بزرگترین خانواده در گروه ویروس‌های گیاهی آر ان‌ای دار تک رشته ای مثبت ($ssRNA^+$) می‌باشد که بر اساس نحوه انتقال توسط ناقلین و خصوصیات ژنومی، به ۱۲ جنس و ۲۴۴ گونه تقسیم‌بندی شده‌است. بزرگترین جنس این خانواده جنس *Potyvirus* است (ICTV. 2023. ICTV Master Species List 38 (2022 V1). اعضای این جنس پیکره‌ای به طول ۶۸۰-۹۰۰ نانومتر و قطری حدود ۱۱-۱۳ نانومتر دارند. پوتی‌ویروس‌ها توسط شته به روش ناپایا انتقال می‌یابند و برخی از اعضای آن توسط بذر نیز منتقل می‌شوند (Nigam *et al.*, 2019). ژنوم با استراتژی پلی‌پروتئینی و زیرژنومی بیان شده، با استفاده از پروتئازهای خود ویروس، پلی‌پروتئین تولیدی شکسته و پروتئین‌های عملکردی و ساختاری به تعداد ۱۰ عدد تولید می‌شوند که شامل P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg , NIa, NIb, CP می‌باشند (Valli *et al.*, 2015). پروتئین P1 درای نقش پروتئازی است و در بروز نشانه‌ها، تکثیر ژنوم و تعیین دامنه میزبانی نیز نقش دارد. پروتئین پوششی (CP) در محافظت و تکثیر ژنوم، انتقال با شته، حرکت سیستمیک و سلول به سلول ویروس نقش دارد (Danci *et al.*, 2009). معمولا از پروتئین پوششی برای اهداف تاکسونومیکی استفاده می‌شود. بقالیان و همکاران (Baghalian *et al.*, 2010) درخت تبارزایی ویروس کوتولگی زرد پیاز(OYDV) را بر اساس پروتئین پوششی (CP) آن رسم کردند. معصومی و همکاران (Masumi *et al.*, 2011) با استفاده از ناحیه میانی ترادف نوکلئوتیدی پروتئین پوششی، پوتی‌ویروس‌های غلات در ایران را طبقه‌بندی نمودند. آذرفر و همکاران (Azarfar *et al.*, 2012) بر اساس ترادف قسمتی از ژن *cp* تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی را برای ویروس موزائیک زرد کدو-(ZYMV) جدایه فارس انجام دادند.

منطقه کدکننده پروتئیناز P1 در بین همه پوتی‌ویروس‌ها، متنوع‌ترین بخش ژنوم بوده، عمدتا غیرحفاظت‌شده است و در سازگاری موفقیت آمیز پوتی‌ویروس‌ها به طیف وسیعی از گونه‌های میزبان نقش دارد (Valli *et al.*, 2007).

نسل جدید توالی‌یابی NGS (Next generation sequencing) به‌عنوان یک تحول بزرگ در ابزار ژنومی محسوب می‌شود این روش باعث ایجاد بینشی دقیق و تغییر وسیعی در چشم‌انداز مباحث ژنومیکس (Genomics) شده‌است. عدم نیاز به دانش و اطلاعات قبلی از عوامل بیماری‌زا، ردیابی همزمان چند عامل بیماری‌زا، هزینه کمتر، سرعت بیشتر، اندازه نمونه کمتر و دقت بیشتر از مزایای NGS نسبت به روش‌های سنتی توالی‌یابی هستند (Zhang *et al.*, 2011).

در این تحقیق خصوصیات مولکولی و ویژگی‌های تبارزایی دو جدایه از ویروس VMV با استفاده از تجزیه و تحلیل‌مولکولی ژن‌های *cp* و p_1 مورد بررسی قرار گرفته‌است.



A B C D E

شکل ۱- تنوع نشانه‌های مشاهده شده روی برگ‌های گیاه پروانش A: زردی و پیسکی شدید B: موزائیک شدید و پیچیدگی C: موزائیک خفیف D: زردی و چین‌دار شدن E: حالت تاولی و پیچیدگی

Figure 1- Diversity of the symptoms observed on the leaves of the vinca plants A: Severe yellowing and mottling B: Severe mosaic and leaf curling C: Mild mosaic D: yellowing and wrinkling E: blistering and leaf curling

مواد و روش‌ها

نشانه‌های شبه ویروسی مانند موزائیک شدید تا خفیف، زردی، تاولی، پیسک، چین‌دار شدن و پیچیدگی بروی برگ‌های گیاه پیچ‌تلگرافی در محوطه پردیس دانشگاه فردوسی مشهد در بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ مشاهده شد (شکل ۱). آران‌ای کل نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از کیت استخراج آران‌ای کل، شرکت پرومگا آمریکا (Promega, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شده، پس از انجام نانودراپ و تعیین کیفیت، نمونه‌های استخراج‌شده برای تعیین توالی آران‌ای کل (RNA-Seq) به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Inc., South Korea) ارسال شد. برای تایید نتیجه به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل توالی‌ها با نرم‌افزار CLC، دوباره از گیاهان دارای نشانه‌ها نمونه‌برداری شد و با استفاده از آغازگرهای عمومی NIb (Ha *et al*., 2008) و اختصاصی ویروس VMV بر مبنای ژن *cp* (VMV-CPF: TCGGAGTCCCTTGTCTCTAT, VMV-CPR: AACGAGGCGAGAATACATCC)، نتایج توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction- PCR) مورد تأیید قرارگرفت. بدین صورت‌که در ابتدا برای سنتز cDNA ۵ میکرولیتر (µl) از اسیدریبونوکلئیک کل استخراج شده، ۲ میکرولیتر آغازگر برگشت و ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل ترکیب و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد سپس ۲ میکرولیتر dNTP (10 mm)، ۴،۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۴ میکرولیتر بافر M-MLV RT 5x و نیم میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase-, M-MLV (200 U/µl) متعلق به شرکت تاکارا (Takara, Japan) به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس سنتز شد. سپس آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت و مسترمیکس شرکت Ampliqon دانمارک صورت گرفت. جهت انجام این آزمون، ۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده به‌عنوان الگو، ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (هر یک به غلظت ۱۰ میکرومولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش MasterMix Red-Ampliqon شرکت آمپلیکون دانمارک با هم ترکیب شدند. واکنش ساخت cDNA و PCR در دستگاه ترموسایکلر A & E ساخت کمپانی Techne کشور انگلستان انجام شد.

چرخه دمایی این آزمون برای ژن *nib* شامل: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس (°C) به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۴ چرخه متوالی شامل ۹۴ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه و در آخر، مرحله گسترش نهایی در مدت زمان ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. برای ژن *cp* چرخه دمایی شامل: ۹۴ °C به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل ۹۴ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه و در آخر، مرحله گسترش نهایی به‌مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد.

تمامی محصولات واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده با گرین ویور (با استفاده از EcoDye DNA Staining Solution-Mxcell) در الکتروفورز از هم جدا شدند. سپس باندهای تکثیری مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل Qiagen متعلق به شرکت کیاژن (Qiaquick gel extraction kit, Germany) از روی ژل آگارز خالص‌سازی شدند و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های دریافت‌شده ابتدا در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل تبارزایی

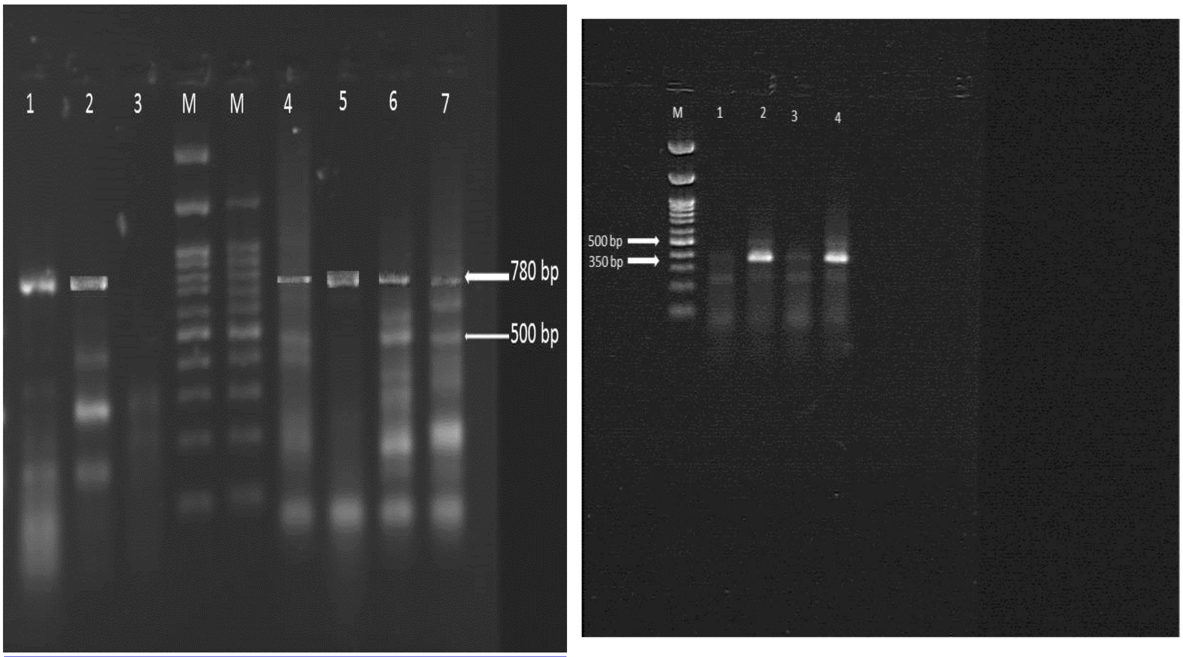
جهت مقایسه هم‌ردیفی چندگانه بین توالی‌ها و تعیین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی از نرم‌افزار Clustal Omega در EBI استفاده شد. لازم به ذکر است که توالی‌های نوکلئوتیدی در پایگاه داده NCBI قسمت Open Reading Frame Finder, (ORFfinder) به توالی‌های آمینواسیدی ترجمه شدند.

برای تعیین روابط تبارزایی و مشخص شدن منشا تکاملی

جدایه‌های ایرانی، درخت تبارزایی‌براساس ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن های *cp* و *p1* با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و به روش (ML) Maximum-Likelihood بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) رسم شد. برای ترسیم ماتریس شباهت بین جدایه‌ها در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی از نرم‌افزار SDT (v.1.2) و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روش Muscle استفاده شد

نتایج

تجزیه و تحلیل نتایج با نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.12.0.3 نشان داد که این گیاهان به دو جدایه از ویروس VMM آلوده هستند. توالی ژن‌های *cp* و *p1* جدایه‌های VMV مشخص شد. تأیید این نتایج با آغازگر عمومی پوتی‌ویروس‌ها مربوط به ژن *Nib* و آغازگر اختصاصی ژن *CP* ویروس VMV در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نشان‌دهنده تکثیر قطعاتی به طول ۳۵۰ و ۷۸۰ جفت‌باز برای ژن‌های *Nib* و *CP* بود (شکل ۲).



شکل ۲- در سمت راست تصویر الکتروفورز قطعه تکثیر شده (۳۵۰ جفت‌بازی) مربوط به بخشی از ژن *Nib* و در سمت چپ تصویر قطعه تکثیر شده (۷۸۰ جفت‌بازی) مربوط به ژن *CP* ویروس VMV در واکنش RT-PCR

Figure 2- On the right side of the image, electrophoresis of the amplified fragment (350 bp) corresponding to a part of the *NIb* gene (350 bp), on the left side of the image, amplified fragment electrophoresis *CP* gene VMV (780 bp) in the RT-PCR reaction

به‌منظور انجام تجزیه و تحلیل تبارزایی، در ابتدا هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی میان جدایه‌های ایرانی VMV و برخی از سایر پوتی‌ویروس‌های ثبت شده در بانک ژن از نقاط مختلف جهان صورت گرفت.

درصد تشابه VMV-IR-1 و VMV-IR-2با یکدیگر برای ژن *cp* در سطح نوکلئوتیدی ۹۳,۱۱ و در سطح آمینواسیدی ۹۷,۰۰ و برای ژن *p1* درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی ۶۸,۳۵ و در سطح آمینواسیدی ۹۷,۰۰ بود. بیشترین و کمترین درصد تشابه ژن‌های *cp* و *p1* VMV-IR-1 و VMV-IR-2 با تعدادی از پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک در جدول ۱ آورده شده‌است.

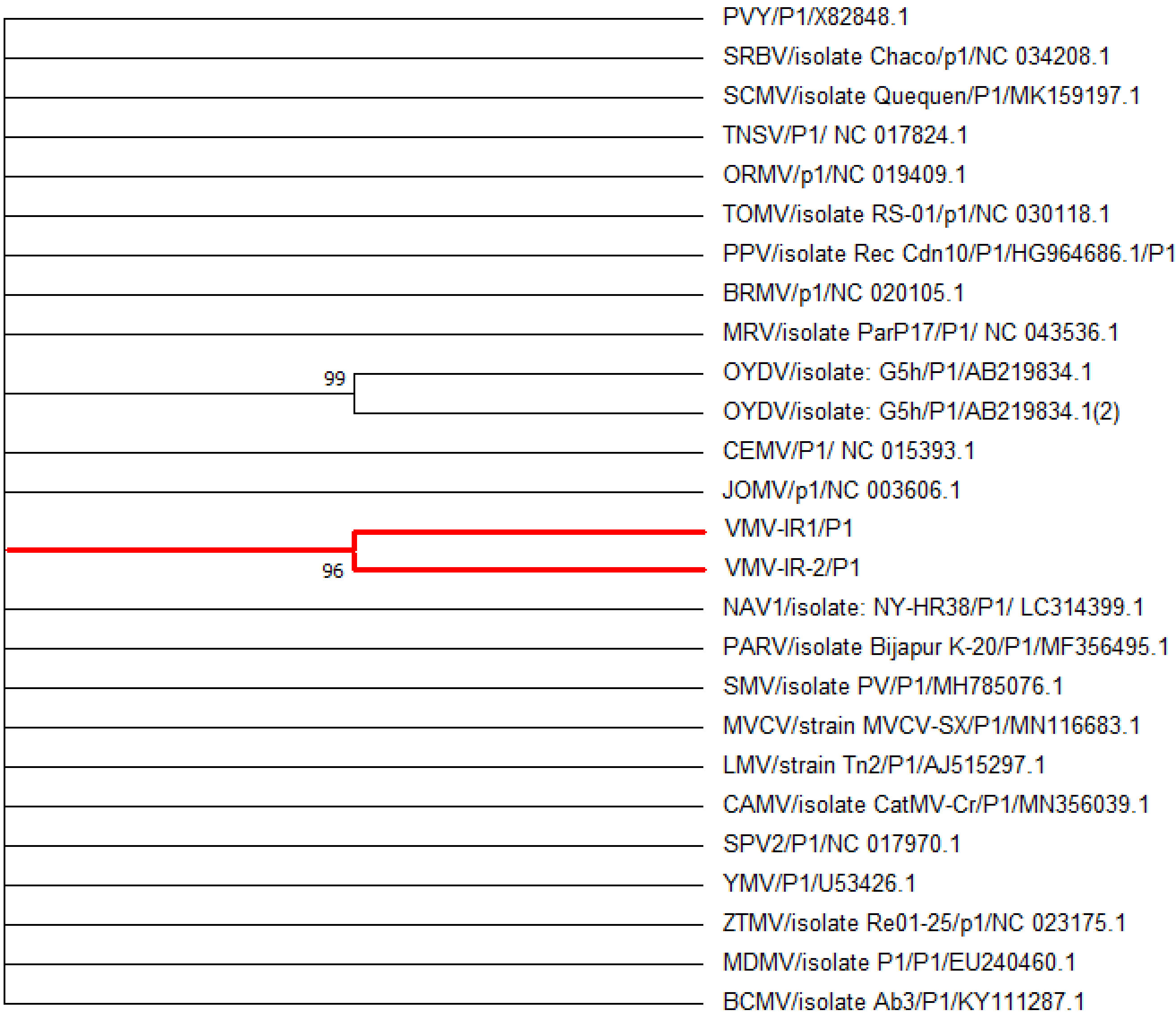
جدول ۱- بیشترین و کمترین درصد تشابه ژن‌های *cp* و *p1* جدایه‌های ایرانی VMV در سطوح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با سایر پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک ژن

Table 1- The highest and the lowest percentages similarity of *cp* and *p1* genes of Iranian VMV isolates at nucleotide and amino acid levels with other potyviruses in the GenBank

	CP				P1			
	NT		AA		NT		AA	
	Highest percentages similarity	Lowest percentages similarity	Highest percentages similarity	Lowest percentages similarity	Highest percentages similarity	Lowest percentages similarity	Highest percentages similarity	Lowest percentages similarity
VMV-IR-1	75.00 ASV1 (*Asparagus virus* 1, KC570975)	26.51 MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*, AJ416633)	70.39 VDMV (*Vanilla distortion mosaic virus*, YP_009091808)	54.78 MVCV (*Malva vein clearing virus*, YP_009667117)	52.29 CatMV (*Catharanthus mosaic virus*, MN356039)	30.92 LMV (*Lettuce mosaic virus*, AJ515297)	28.70 ZTMV (*Zucchini tigre mosaic virus*, QIM40664)	15.61 JGMV (*Johnsongrass mosaic virus*, ASZ83718)
VMV-IR-2	73.82 ASV1	26.17 MDMV	70.39 VDMV	55.51 MVCV	51.31 CAtMV	35.71 ORMV (*Ornithogalum mosaic virus*, QDC21208)	28.70 ZTMV	15.18 ASV1 (*Asparagus virus 1*. YP_009110712)

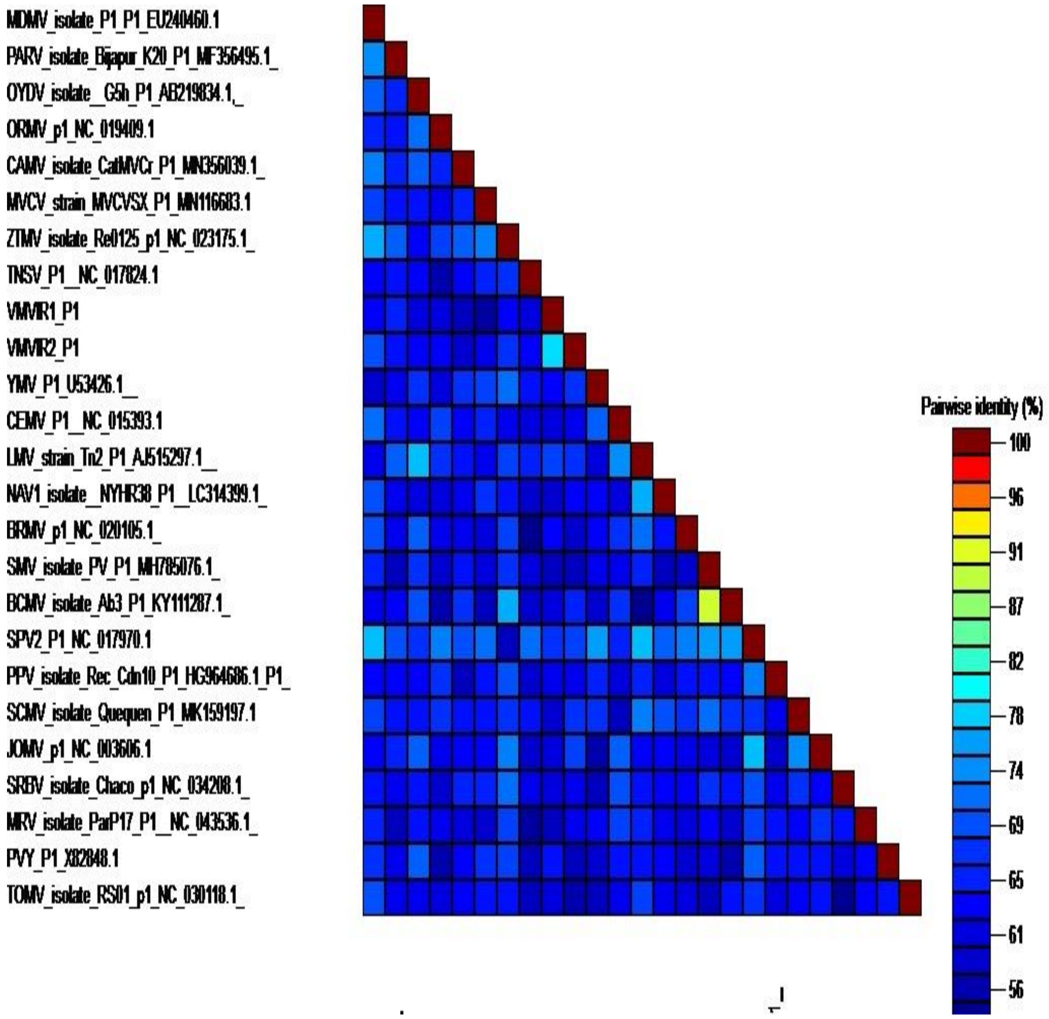
وجود موتیف‌های حفاظت شده مربوط به ژن‌های cp و *p1* پوتی‌ویروس‌ها در ژن‌های این جدایه‌ها بررسی شد. در ناحیه ژنی *P1* موتیف‌های حفاظت شده FIVR، GDSG و FLSG در هر دو جدایه و موتیف IVFG تنها در جدایه VMV1 پیدا شد. در ژن *CP* موتیف‌های MVWCIENGTSP، AFDF، QMKAAAL و DAG پیدا شدند (Aterya *et al*., 1990; Dujovny *et al*., 2000; Chen *et al*., 2020).

جهت تعیین روابط تبارزایی و مشخص نمودن منشا تکاملی آن‌ها، درخت تبارزایی دو جدایه ایرانی VMV به همراه گونه‌های دیگر جنس پوتی‌ویروس موجود در بانک ژن، بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با روش Maximum likelihood با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و بر اساس 1000 تکرار رسم گردید (شکل‌های ۳، ۷، ۵ و ۹). درآنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ناحیه CP پوتی ویروس‌های مورد بررسی به ۲ زیرگروه تقسیم شدند. در سطح آمینواسیدی نزدیک‌ترین ویروس به جدایه‌های VMV، ویروس (*Yam mosaic virus*, YP_022751) YMV که میزان شباهت این ویروس با VMV-IR-1 و VMV-IR-2 به‌ترتیب ۵۹٫۸۶ و۶۲٫۱۲ است. در سطح نوکلئوتیدی با ویروس‌های SPV2 (*Sweet potato virus* 2, MZ962674)، SCMV (*Sugarcane mosaic virus*, KC179704)، OYDV (*Onion yellow dwarf* virus, MH890553) و JGMV (*Johnsongrass mosaic virus*, MH341406) در یک گروه قرار می‌گیرند که درصد شباهت این ویروس‌ها با VMV-IR-1 به‌ترتیب ۶۹٫۴۹، ۷۰٫۹۹، ۶۰٫۶۰، ۵۹٫۴۸ و با VMV-IR-2 ۶۹٫۷۳، ۶۸٫۶۴، ۵۹٫۴۸، ۶۲٫۰۷ هستند. تجزیه و تحلیل تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن *p1* ویروس‌های مورد بررسی را به‌ترتیب به ۳ و ۲ زیرگروه تقسیم نمود. ژن *p1* در سطح نوکلئوتیدی نزدیکترین ارتباط را با ویروس JGMV دارد که درصد تشابه آن با این ویروس به‌ترتیب ۴۱٫۶۷ و ۳۹٫۱۳ درصد است. در سطح آمینواسیدی نزدیکترین ارتباط را با ویروس‌های CeMV(*Celery mosaic virus*, YP_006423973) و YMV دارند که درصد تشابه جدایه‌های ۱ و ۲ VMV با این ویروس‌ها به ترتیب ۲۱٫۱۱ و ۲۳٫۳ درصد با YMV و ۲۲٫۵۷ و۲۶٫۰۷ با CeMV است. ماتریکس درصد تشابه میان جدایه‌های ایرانی VMV و سایر پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 در سطوح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی برای ژن‌های *cp* و *p1* رسم شدند (شکل‌های ۴، ۶، ۸ و ۱۰).



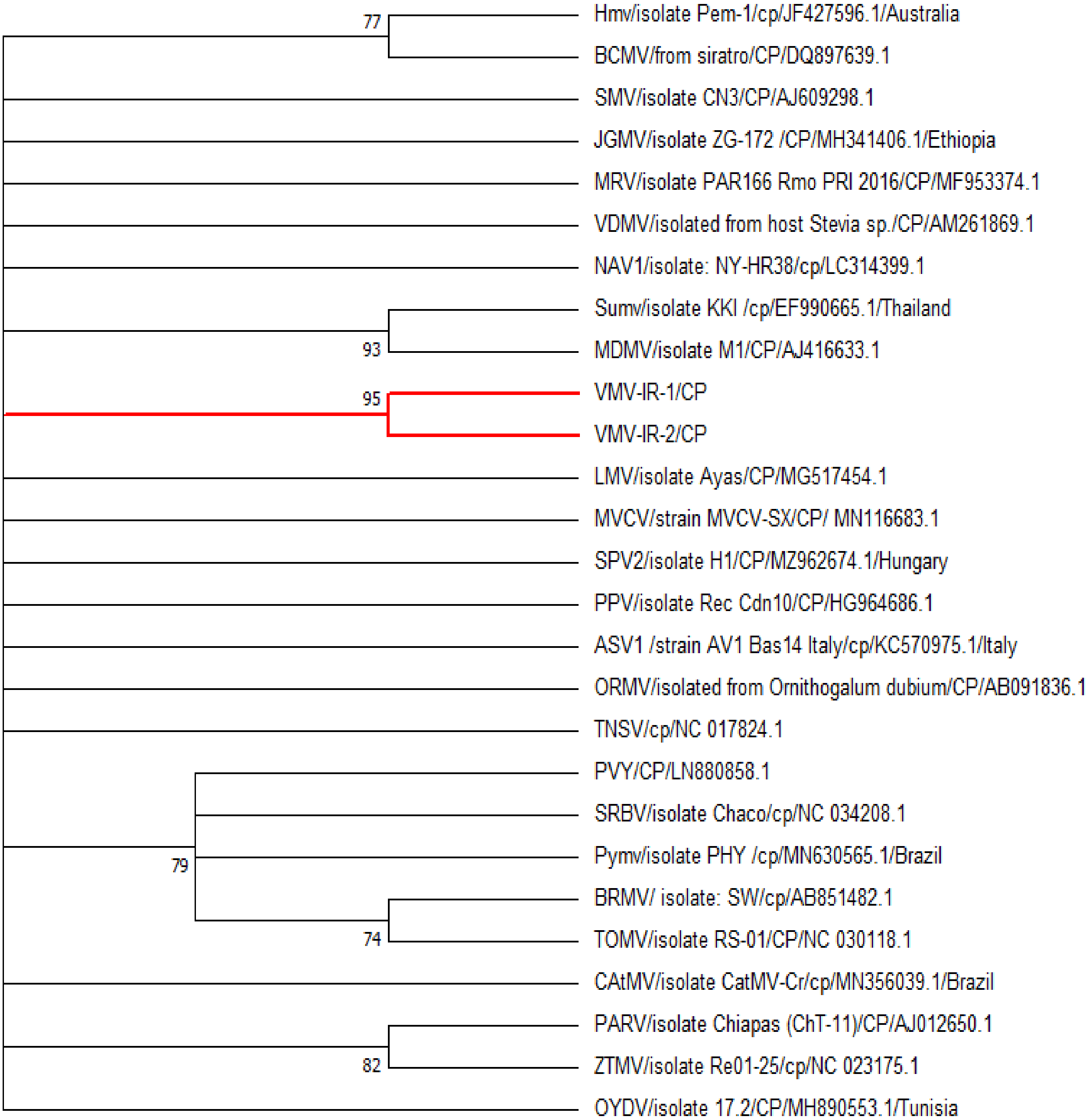
شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از روش Maximum-likelihood در نرم‌افزار MEGA 7 حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *p1* دو جدایه ایرانی ویروس VMV به همراه توالی ژن *p1* تعدادی از پوتی‌ویروس‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن، اعداد نمایانگر درصد Bootstrap بر اساس 1000 تکرار می‌باشند (Bootstrap کمتر از ۷۰ درصد در درخت نمایش داده نشده است).

Figure 3- Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA7 software constructed based on multiple *p1* nucleotide sequence alignments of two VMV Iranian isolates with some of the potyviruses available in the Gene Bank. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 replications.



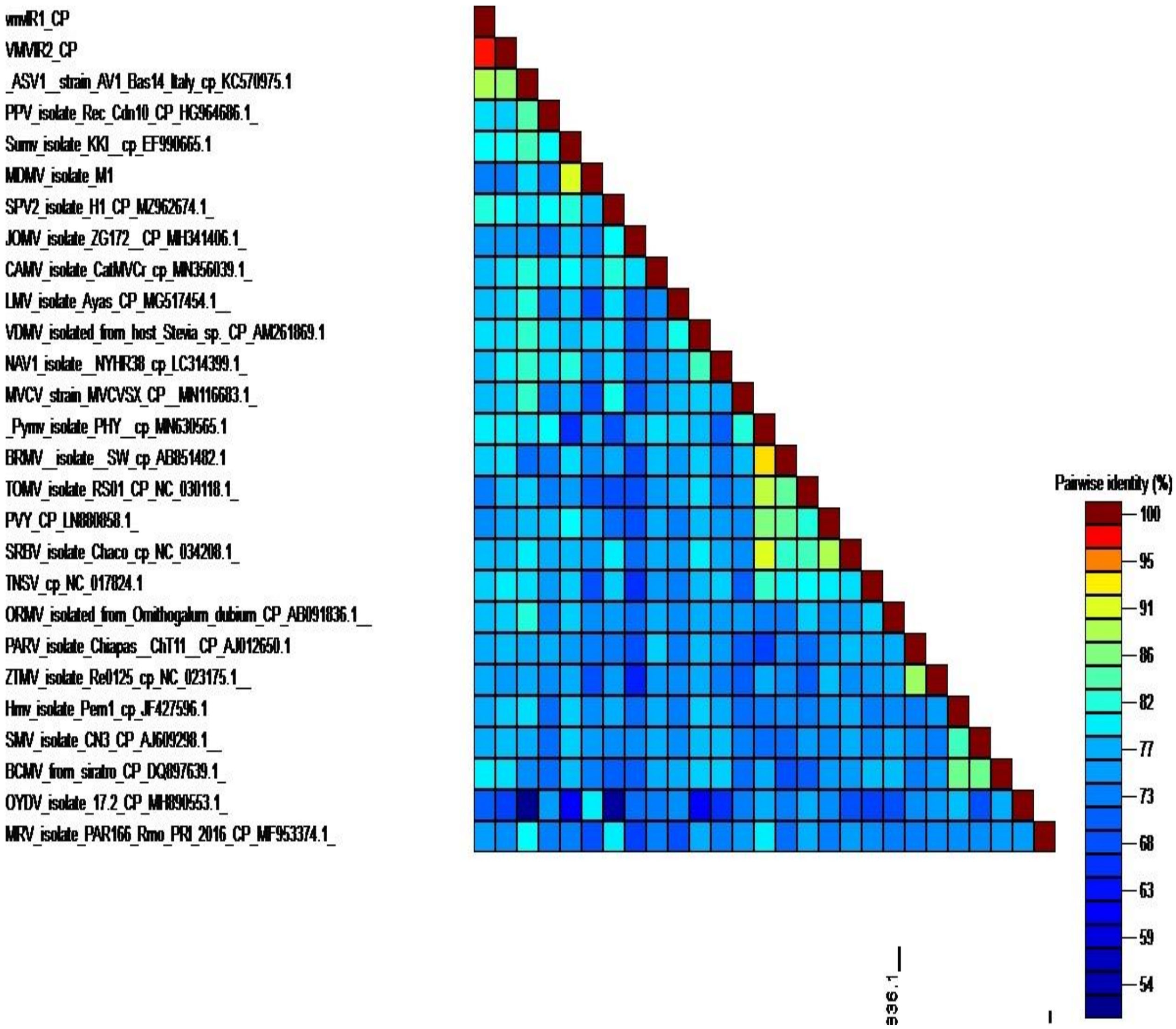
شکل ٤- ماتریکس شباهت در سطح نوکلئوتیدی ژن P1 جدایه‌های VMV و تعدادی از اعضای جنس پوتی‌ویروس با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روش MUSCLE ترسیم شد

Figure 4- The similarity matrix of *p1* nucleotide sequence of VMV isolates with some members of genus potyvirus constructed based on SDT MUSCLE alignment



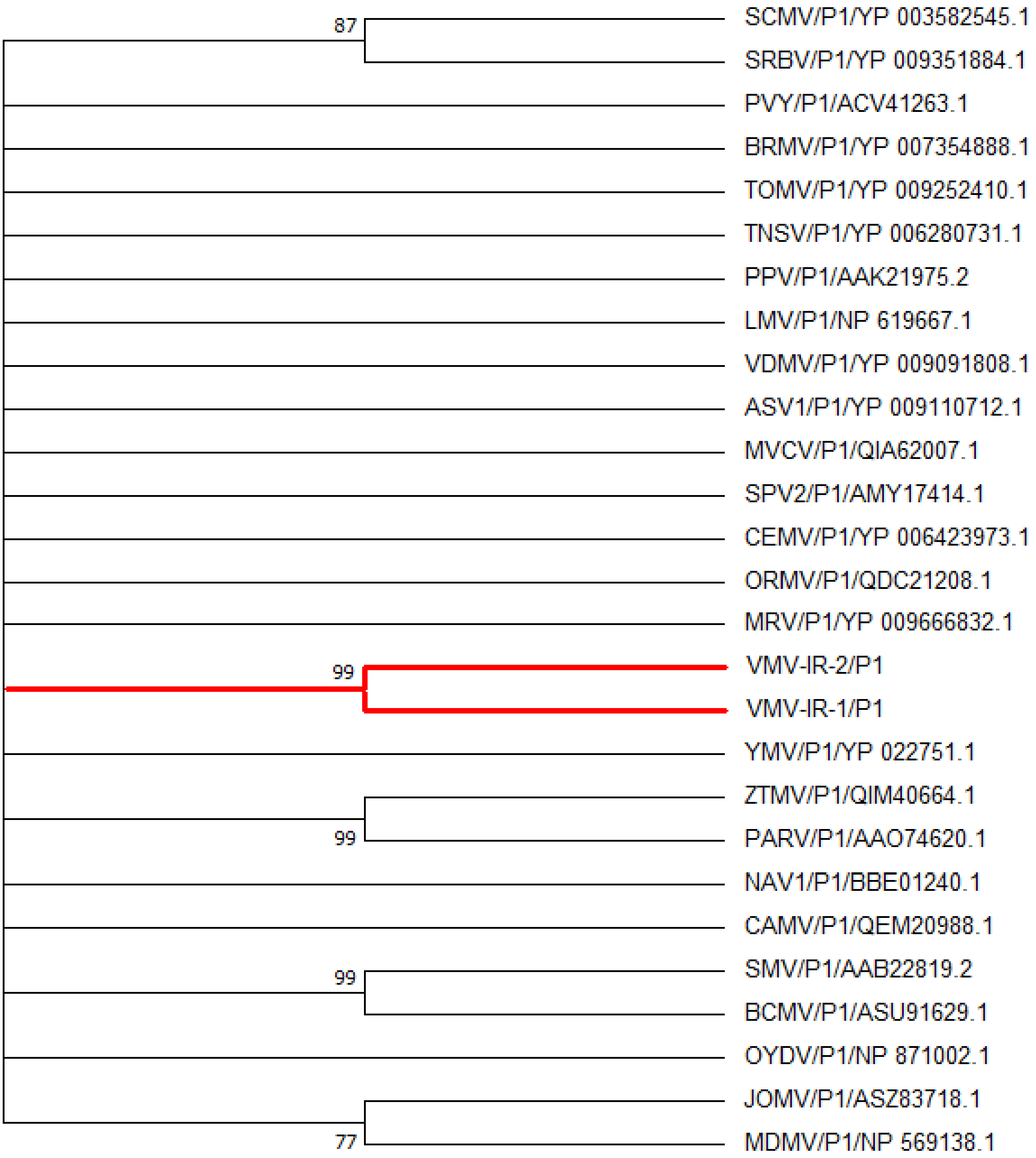
شکل ۵- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از روش Maximum-likelihood در نرم‌افزار MEGA 7 حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *CP* دو جدایه ایرانی ویروس VMV به همراه توالی ژن CP تعدادی از پوتی‌ویروس‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن، اعداد نمایانگر درصد Bootstrap بر اساس 1000 تکرار می‌باشند (Bootstrap کمتر از ۷۰ درصد در درخت نمایش داده نشده است).

Figure 5- Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA7 software constructed based on multiple *CP* nucleotide sequence alignments of two VMV Iranian isolates with some of the potyviruses available in the Gene Bank. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 replications.



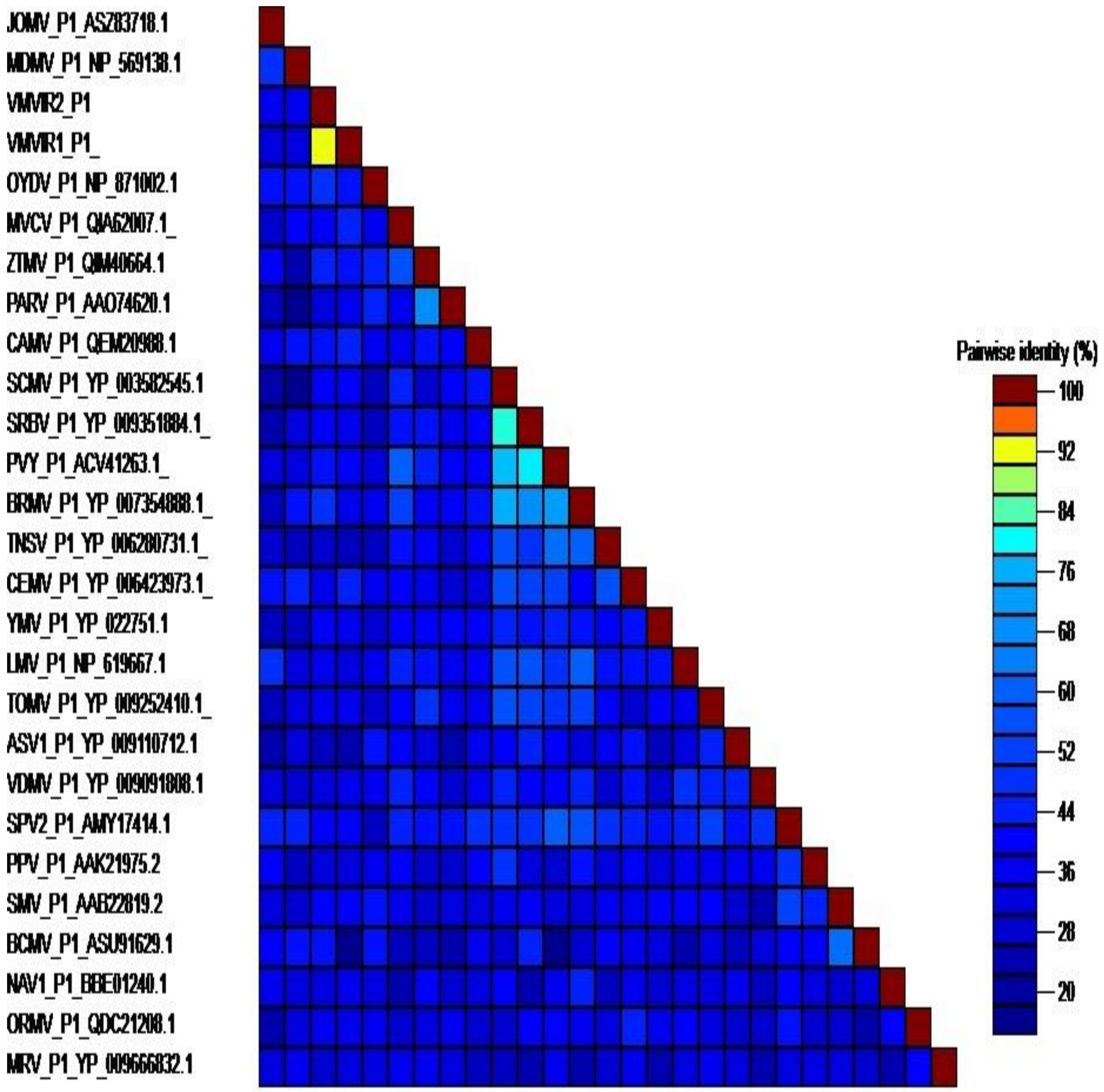
شکل ٦- ماتریکس شباهت در سطح نوکلئوتیدی ژن *CP* جدایه‌های VMV و تعدادی از اعضای جنس پوتی‌ویروس با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روش MUSCLE ترسیم شد

Figure 6- The similarity matrix of *CP* nucleotide sequence of VMV isolates with some members of genus potyvirus constructed based on SDT MUSCLE alignment



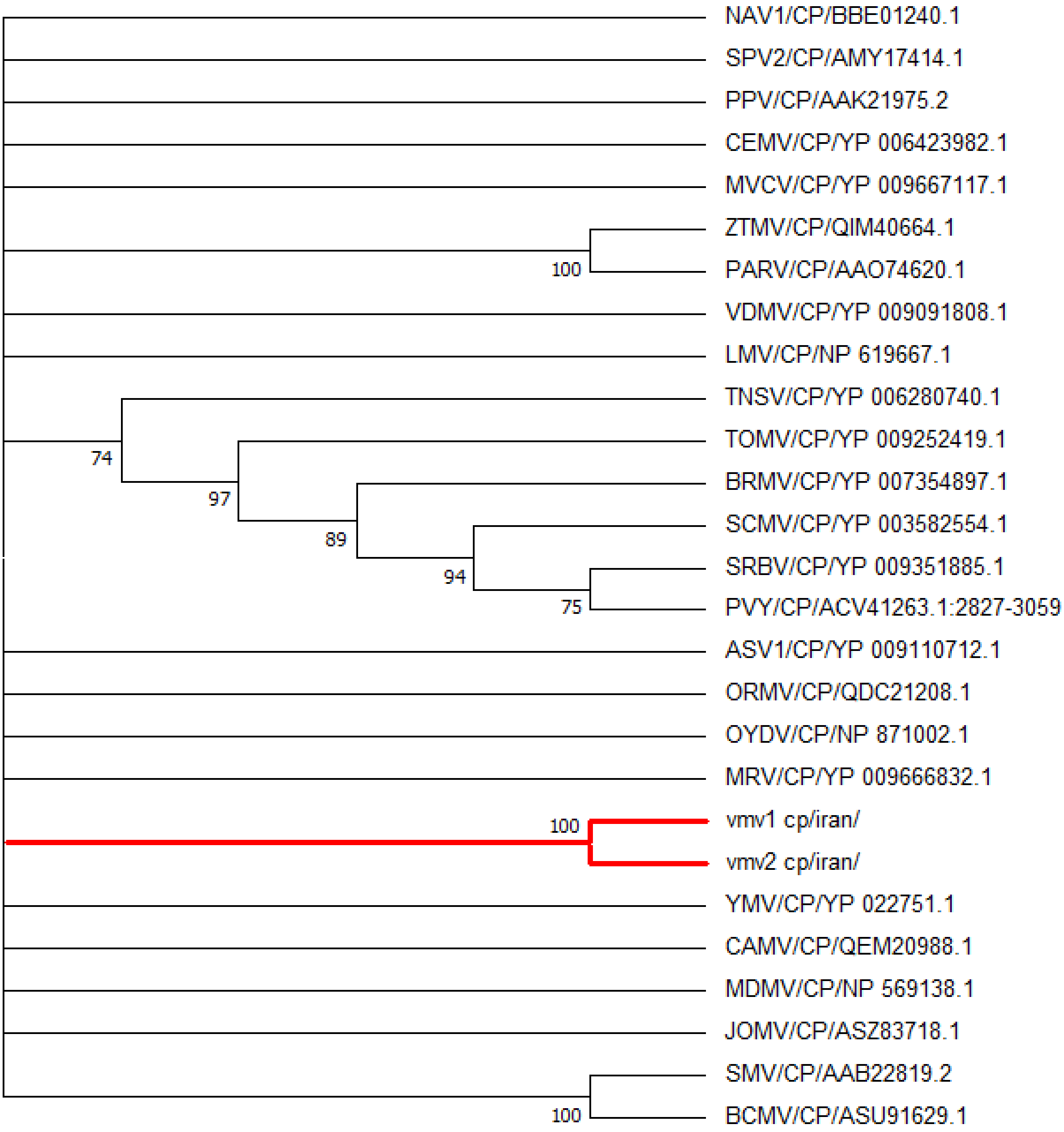
شکل ۷- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از روش Maximum-likelihood در نرم‌افزار MEGA 7 حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف آمینواسیدی P1 دو جدایه ایرانی ویروس VMV به همراه توالی آمینواسیدی P1 تعدادی از پوتی‌ویروس‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن، اعداد نمایانگر درصد Bootstrap بر اساس 1000 تکرار می‌باشند (Bootstrap کمتر از ۷۰ درصد در درخت نمایش داده نشده است).

Figure 7- Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA7 software constructed based on multiple P1 amino acid sequence alignments of two VMV Iranian isolates with some of the potyviruses available in the Gene Bank. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 replications



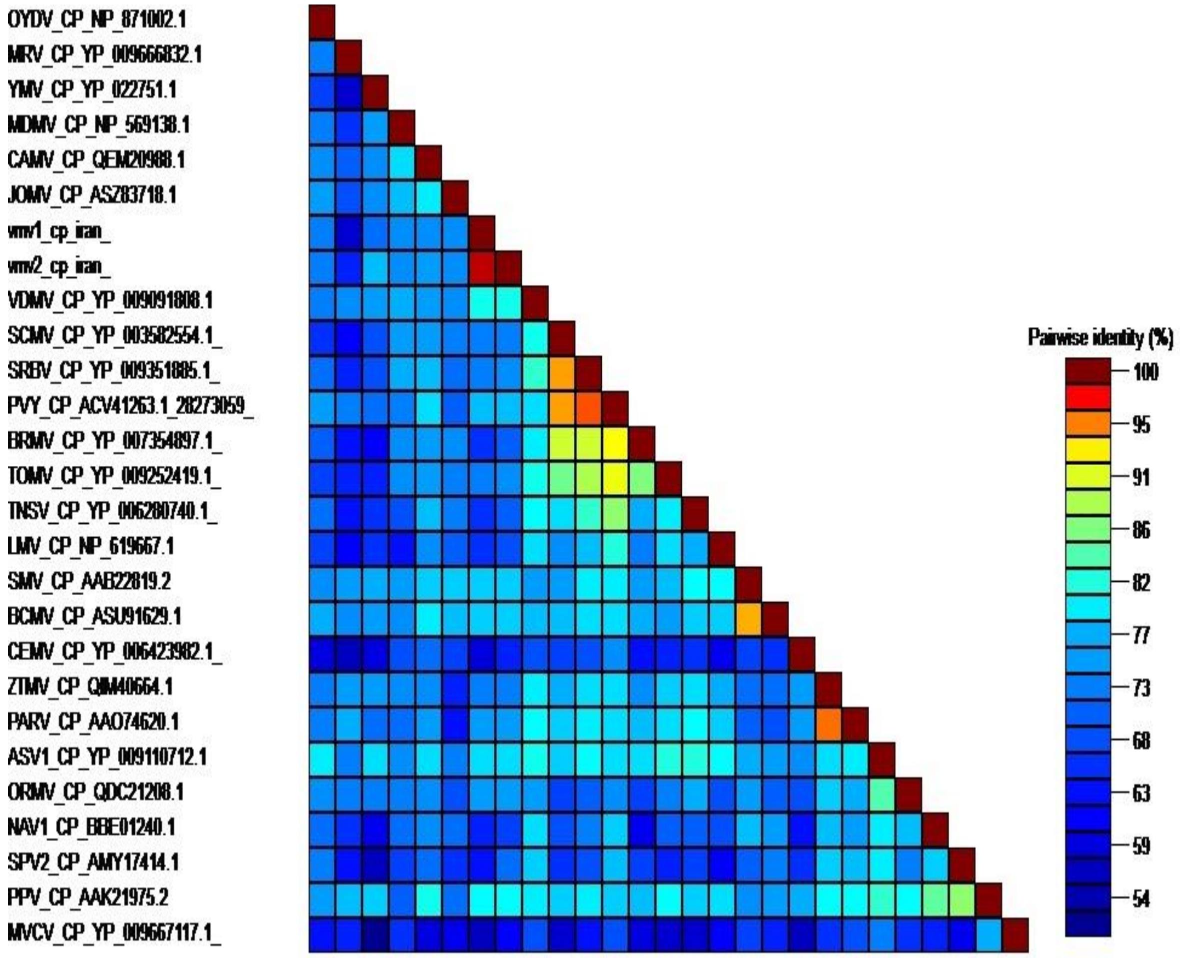
شکل ۸- ماتریکس شباهت در سطح آمینواسیدی P1 جدایه‌های VMV و تعدادی از اعضای جنس پوتی‌ویروس با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روشMUSCLE ترسیم شد

Figure 8- The similarity matrix of P1 amino acid sequence of VMV isolates with some members of genus potyvirus constructed based on SDT MUSCLE alignment



شکل ۹- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از روش Maximum-likelihood در نرم‌افزار MEGA 7 حاصل از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف آمینواسیدی CP دو جدایه ایرانی ویروس VMV به همراه توالی آمینواسیدی CP تعدادی از پوتی‌ویروس‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن، اعداد نمایانگر درصد Bootstrap بر اساس 1000 تکرار می‌باشند (Bootstrap کمتر از ۷۰ درصد در درخت نمایش داده نشده است).

Figure 9- Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA7 software constructed based on multiple CP amino acid sequence alignments of two VMV Iranian isolates with some of the potyviruses available in the Gene Bank. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 replications.



شکل ۱۰- ماتریکس شباهت در سطح آمینواسیدی CP جدایه‌های VMV و تعدادی از اعضای جنس پوتی‌ویروس با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روش MUSCLE ترسیم شد

Figure 10- The similarity matrix of CP amino acid sequence of VMV isolates with some members of genus potyvirus constructed based on SDT MUSCLE alignment

بحث

پروتئین پوشش ویروس‌های گیاهی، پروتئینی با چندین عملکرد است و در تجمع و گردایش ویروس، حرکت موضعی و سیستمیک ویروس و انتقال با شته نقش دارد (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). توالی پروتئین پوششی به سه ناحیه‌ی N ترمینال، ناحیه مرکزی و ناحیه C ترمینال تقسیم می‌شود که توالی ناحیه N ترمینال تنوع‌پذیری بیشتری دارد. در این ناحیه توالی حفاظت شده DAG (آسپارانین، آلانین، گلیسین) وجود دارد که با HC-Pro برای انتقال با شته واکنش می‌دهد (Hasiow-Jaroszewska *et al.*, 2014) در نتیجه برای انتقال حیاتی است. ناحیه‌ی مرکزی تنوع کمتری نشان می‌دهد، زیرا این ناحیه برای حرکت سلول به سلول ویروس ضروری است و درنتیجه جهش در آن در گسترش ویروس اثر دارد (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). مقایسه هم‌ردیفی چندگانه ترادف‌های ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس VMV با سایر پوتی ویروس‌ها نشان‌داد که قسمت میانی حفاظت‌شده‌ترین بخش پروتئین پوششی جدایه‌های VMV و همینطور گونه‌های مختلف پوتی‌ویروس‌هاست که نتایج پژوهش‌های قبلی روی ژن *cp* پوتی‌ویروس‌ها این نتیجه را تأیید می‌کند (Farahbakhsh *et al.*, 2013). حفاظت‌شدگی بالا در ناحیه مرکزی ژن *cp* نشان‌دهنده اهمیت این ناحیه در ساختار و هم آرایش ملکول‌های CP است (Shukla & Ward, 1989)، در حالی‌که تنوع در ناحیه N-terminal نشان‌دهنده نقش این ناحیه در برهمکنش ویروس–ناقل و میزبان است (Reichmann *et al.*, 1992)، با توجه به این موضوع در ابتدا پیش‌بینی می‌شد دو جدایه VMV از نظر صفات بیولوژیک و برهمکنش ویروس–میزبان مانند انتقال با شته و یا دامنه میزبانی با

یکدیگر تفاوت داشته باشند ولی از آنجایی‌که در سطح آمینواسیدی تفاوت دو جدایه اندک است بنظر می‌رسد تغییرات نوکلئوتیدی نقش کمکی و جزئی‌تری در تغییر وظائف پروتئین پوششی داشته باشد. وجود موتیف DAG در هر دو جدایه این ویروس نشان‌دهنده احتمال انتقال آنها با شته در طبیعت می‌باشد. از جمله پروتئازهای ویروسی پروتئین P1 است که یک سرین پروتئاز ویروسی است که پلی‌پروتئین را در انتهای کربوکسیلی خود و پروتئین بعدی برش می‌دهد. دامنه پپتیداز شبه‌سرین در ناحیه کدکننده P1 در قسمت C ترمینال و بسیار حفاظت شده برای تمام پپتیدازهای سرین، مربوط به فعالیت پروتئولیتیک و حاوی موتیف Gly-Xaa-Ser-Gly وجود دارد (Adams *et al.*, 2005). موتیف دامنه پروتئولیتیک 244GDSG (Gly-Asp-Ser-Gly) 247 در ژنوم VMV وجود دارد که به‌عنوان محل فعالیت یک پروتئاز سرین (مسئول فعالیت خودبرشی P1) در نظر گرفته می‌شود که در پایین دست پروتئین را در محل F (یا Y) می‌شکافد. محل برش P1 بین (y) Tyr و Ser(S) است (Verchot *et al.*, 1992). با توجه به اینکه ژن *p1* غیرحفاظت‌شده‌ترین بخش ژنی پوتی‌ویروس‌هاست موتیف‌های حفاظت شده این قسمت از ژنوم، محل انجام فعالیت‌های حیاتی این ژن از قبیل فعال‌شدن پروتئاز سرین برش‌دهنده پروتئین‌های پایین‌دستی و همینطور مسئول تعاملات پروتئین P1 با سایر پروتئین‌های ویروسی و یا گیاه میزبان هستند (Chen *et al.*, 2003; Rohozkova & Navratil, 2011 ; Valli *et al.*, 2007). در پوتی‌ویروس‌ها p1 در تنظیم و تعدیل تکثیر و پاسخ‌های دفاعی میزبان دخالت دارد (Verma *et al.*, 2015). مشاهده بالاترین میزان تنوع در ناحیه ژنی *p1* با نتایج بدست آمده از مطالعه سایر محققین برروی گونه‌های دیگر پوتی‌ویروس مطابقت دارد (Ohshima *et al.*, 2007 ؛ Lecoq *et al.*, 2009؛ Verma *et al.*, 2015).

دندروگرام رسم شده بر مبنای توالی‌های آمینواسیدی و نوکلئوتیدی ژن‌های *CP* و *P1* جدایه‌های VMV را درمیان اعضای جنس پوتی‌ویروس گروه‌بندی کرد. درخت تبارزایی رسم‌شده براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *CP* نشان می‌دهد که جدایه‌های VMV نزدیکترین ارتباط را با SPV2 دارد و با توجه به اینکه این جدایه SPV2 از کشور مجارستان است و گیاه وینکا بومی اروپا است و از اروپا وارد ایران شده است احتمالا جد این دوتا ویروس یکی است. همینطور جدایه‌های VMV با ویروس‌های OYDV، JGMV، SCMV و SPV2 در یک زیرگروه قرار می‌گیرند.

ویروس‌هایی که بیشترین درصد شباهت را با جدایه‌های VMV دارد در گروه‌های تبارزایی مجزایی قرار گرفتند، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ارتباطی بین روابط تبارزایی با درصد تشابه توالی این ویروس‌ها وجود ندارد. نتیجه پژوهش آذرفر و همکاران (Azarfar *et al.*, 2012) روی پوتی‌ویروس ZYMV نیز نشان داد که روابط تبارزایی با درصد تشابه توالی‌ها همخوانی ندارد. در درخت‌های حاصل از مطالعات تبارزایی بر اساس ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مشاهده‌شده جدایه‌های ایرانی VMV از سایر گونه‌های جنس پوتی ویروس تفکیک شدند. بنابراین آغازگر طراحی شده قابلیت تفکیک جدایه‌های VMV از گونه‌های دیگر موجود در آن جنس را داراست.

برای ژن *p1* بالاترین درصد تشابه نوکلئوتیدی VMV-IR-1 وVMV-IR-2 با ویروس‌های مورد بررسی، ۵۲،۲۹ و ۵۱،۳۱ با ویروس CatMV است. با توجه به متفاوت و متغیر بودن ژن *p1* رنگ‌بندی نسبتا یکنواخت ماتریکس درصد تشابه قابل پیش‌بینی و قابل پذیرش است.

در این پژوهش برای اولین بار خصوصیات مولکولی جدایه‌های VMV بر پایه ژن‌های *cp* و *p1* تعیین شد و جایگاه تبارزایی دو جدایه ایرانی VMV در بین پوتی‌ویروس‌های موجود در بانک ژنی مشخص شد.

با توجه به اهمیت پوتی‌ویروس‌ها به‌عنوان بزرگترین و مهمترین جنس در خانواده پوتی‌ویریده و همینطور اهمیت گیاه پیچ تلگرافی از جنبه دارویی و زینتی بودن گیاه، تأثیر ویروس‌ها روی میزان متابولیت‌های ثانویه و همینطور تکثیر رویشی این گیاه که امکان انتقال و پراکنش بیماری‌های ویروسی به نسل بعد و گیاهان در نقاط جدید را فراهم می‌کند، لذا باید به بیماری‌های ویروسی روی این گیاه توجه ویژه داشت و ضمن بررسی و تعیین ویروس‌های غالب، تنوع ژنتیکی این ویروس‌ها، شناسایی ناقلین، از برنامه کنترلی کارآمد برای کنترل و کاهش بیماری‌های ویروسی از قبیل استفاده از پایه مادری سالم و کنترل ناقلین و سایر روش‌ها استفاده نمود.

References

1. Adams, M. J., Antoniew, J. E., & Fauquet, C. M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, *150*, 459-479. https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6
2. Al-Zahrani, H. S. M., Elbeshehy, E. K. F., Aldhebiani, A.Y., & Elbeaino, T. (2017). Effect of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infection on antineoplastic alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) cultured in the Mecca region and resistance induction by plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *32*(1), 49-57. https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1669490

3. Al-Zahrany, H. M., Elbeshehy, E. K. F., Aldhebiani, A.Y., Almaghrabi, O., Al-Jaddawi, A.A., & Alzahrani, A.H. (2019). Effect of *Catharanthus mosaic virus* (CatMV) on antineoplastic alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) cultured in Mecca region and resistance induction by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33*(1), 1392-1401. https://doi.org/10.1007/s40858-020-00346-9
4. Atreya, C. D., Raccah, B., & Pirone, T. P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology, 178*(1), 161-165. https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90389-9
5. Azarfar, A., Izadpanah, K., Afsharifar, A., & Masumi, M. (2012). Purification and the complete genome sequence of *Zucchini yellow mosaic virus*- Fars isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology, 48*(3), 403-409. (In Persian with English abstract)
6. Baghalian, K., Kim, O. K., & Natzuaki, K. T. (2010). Molecular variability and genetic structure of the population of *Onion yellow dwarf virus* infecting garlic in Iran. *Virus Genes, 41*(2), 282-291. https://doi.org/10.1007/s11262-010-0514-3
7. Berger, P. H. (2001). Potyviridae. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. https://doi.org/10.1038/npg.els.0000755
8. Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Surcher, E. J. (1996). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*.
9. Chen, J., Adams, M. J., Zheng, H.Y., & Chen, J.P. (2003). Sequence analysis demonstrates that *Onion yellow dwarf virus* isolates from China contain a P3 region much larger than other potyviruses. *Archives of Virology, 148*(6), 1165-1173. https://doi.org/10.1007/s00705-003-0020-1
10. Chen, Z., Anane, R. F., Wang, Z., Yang, L., Chen, L., Wen, G., & Zhao, M. (2020). Complete genome sequence of a novel potyvirus isolated from *Polygonatum kingianum*. *Archives of Virology*, *165*(9), 2127-2131. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04717-0.
11. Ciorita, A., Zagrean-Tuza, C., Mot, A. C., Carpa, R., & Parvu, M. (2021). The phytochemical analysis of *Vinca* L. species leaf extracts is correlated with the antioxidant, antibacterial, and antitumor effects. *Molecules, 26*(10), 3040. https://doi.org/10.3390/molecules26103040
12. Danci, O., Ziegler, A., Torrance, L., Gasemi, S., & Danci, M. (2009). Potyviridae family- short review. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 13*, 410-420.
13. Duarte, L. M. L., Salatino, M. L. F., Salatino, A., Negri, G., & Barradas, M. M. (2008). Effect of Potato virus X on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. *Summa Phytopathologica*, *34*(1), 65-67. https://doi.org/10.1590/s0100-54052008000100013
14. Dujovny, G., Sasaya, T., Koganesawa, H., Usugi, T., Shohara, K., & Lenardon, S.L. (2000). Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. *Archives of Virology, 145*(11), 2249-2258. https://doi.org/10.1007/s007050070018
15. El-Dougdoug, K., Mohamed, H., & Abo-Senna, A. (2007). Effect of PVY viral infection on alkaloid contents of cultivated medicinal plants. *Journal of Applied Sciences Research*, 558-563. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:128357263
16. Farah Bakhsh, F., Maesomi, M., Afshari Far, A., & Izadpanah, K.L. (2013). Genetic variation of *Bermuda grass southern mosaic virus* isolates based on sequence of 3' region of genome. *Iranian Journal of Plant Pathology, 49*(1), 61-75. (In Persian with English abstract)
17. Farahanikia, B., Akbarzadeh, T., Jahangirzadeh, A., Yassa, N., Shams Ardekani, M.R., Mirnezami, T., Hadjiakhoondi, A., & Khanavi, M. (2011). Phytochemical investigation of *Vinca minor* cultivated in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10*(4), 777-785. https://doi.org/10.22037/ijpr.2011.992
18. Fisher, J.R. (2012). Identification of three distinct classes of Satellite RNAs associated with two *Cucumber mosaic virus* Serotypes from the ornamental groundcover *Vinca minor*. *Plant Health Progress, 13*(1). https://doi.org/10.1094/php-2012-0412-01-rs
19. Fisher, J.R. (2013). First report of *Arabis mosaic virus* infecting *Vinca minor* in Ohio. *Plant Health Progress, 14*(1). https://doi.org/10.1094/php-2013-0901-02-br
20. Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R. M., Vu, M., & Dale, J. L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, *153*(1), 25-36. https://doi.org/10.1007/s00705-007-1053-7
21. Lecoq, H. C., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, A., Lê Van, F., & Fabre, C. (2008). Desbiez, Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: An historical overview, *Virus Research*, *141*(2), 190-200. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.020
22. Hasiow-Jaroszewska, B., Fares, M., & Elena, S. (2014). Molecular evolution of viral multifunctional proteins: the case of Potyvirus HCPro. *Journal of Molecular Evolution*, 78(1), 75–86. https://doi.org/10.1007/s00239-013-9601-0
23. Masumi, M., Zare, A., & Izadpanah, K. (2011). Biological, serological and molecular comparisons of potyviruses infecting poaceous plants in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology, 47*(1), 47-66. (In Persian with English abstract)

24. Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y., & Nazre, M. (2013). Vinca alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, *4*(11), 1231-1235.
25. Nigam, D., LaTourrette, K., Souza, P. F. N., & Garcia-Ruiz, H. (2019). Genome-wide variation in *Potyviruses*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1439. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01439
26. Ohshima, K., Tomitaka, Y., Wood, J., Minematsu, Y., Kajiyama, H., Tomimura, K., & Gibbs, A. (2007). Patterns of recombination in *Turnip mosaic virus* genomic sequences indicate hotspots of recombination. *The Journal of General Virology*, *88*, 298-315. https://doi.org/10.1099/vir.0.82335-0
27. Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E. M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M., & Beug, H. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell*, *71*(7), 1103-1116. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80060-1
28. Rohozkova, J., & Navratil, M. (2011). P1 peptidase - a mysterious protein of family Potyviridae. *Journal of Biosciences*, *36*(1), 189–200. https://doi.org/10.1007/s12038-011-9020-6
29. Saleem Haider, M. S., Tahir, M., Saeed, A., Ahmed, S., Parveen, R., & Rashid, N. (2008). First report of a begomovirus infecting the ornamental plant *Vinca minor* L. *Australasian Plant Disease Notes*, *3*(1), 150. https://doi.org/10.1071/dn08058
30. Shukla, D. D., & Ward, C.W. (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research*, *36*, 273-314. https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60588-6
31. Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Bufo, S. A., & Karaman, R. (2019). The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins (Basel)*, *11*(11), 656. https://doi.org/10.3390/toxins11110656
32. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., & Bernardi F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, *74*, 157–175. https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00220-9
33. Valli, A., Lopez-Moya, J. J., & Garcia, J.A. (2007). Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae. *Journal of General Virology*, *88*(Pt 3), 1016-1028. https://doi.org/10.1099/vir.0.82402-0
34. Valli, A., García, J. A., & López-Moya, J. J. (2015). Potyviridae. In *eLS* (pp. 1-10): Wiley.
35. Verchot, J. M., Herndon, K. L., & Carrington, J. C. (1992). Mutational analysis of the Tobacco Etch Potyviral 35-kDa proteinase:Identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology*, 190, 298–306. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)91216-h
36. Verma, R. K., Mishra, R., & Petrov, N. M. (2015). Molecular characterization and recombination analysis of an Indian isolate of *Onion yellow dwarf virus*. *European Journal of Plant Pathology*, *143*, 437–445. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0695-7
37. Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Davison, A. J., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., Garcia, M. L., Harrach, B., Harrison, R. L., Hendrickson, R. C., Junglen, S., Knowles, N. J., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Lobocka, M., Nibert, M. L., Oksanen, H.M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D. B., Suzuki, N., Van Dooerslaer, K., Vandamme, A. M., Varsani, A., & Zerbini, F. M. (2021). Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). *Archives of Virology*, *166*(9), 2633-2648. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05156-1
38. Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, *38*(3), 95-109. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.02.003